



TITLE:

マウス胚性幹細胞の神経分化におけるクロマチンリモデリング因子  
CHD4/NuRD複合体の役割(  
Abstract\_要旨)

AUTHOR(S):

廣田, 聡

---

CITATION:

廣田, 聡. マウス胚性幹細胞の神経分化におけるクロマチンリモデリング因子CHD4/NuRD複合体の役割. 京都大学, 2019, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2019-03-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k21922>

RIGHT:

(続紙 1 )

京都大学	博士（生命科学）	氏名	廣田 聡
論文題目	マウス胚性幹細胞の神経分化におけるクロマチンリモデリング因子 CHD4/NuRD複合体の役割		
(論文内容の要旨)			
<p>生物個体が正常な発生を行うためには、外胚葉、中胚葉及び内胚葉への分化が適切に行われる必要がある。多能性幹細胞から外胚葉への分化のうち、神経系列への分化は起こりやすく、分化のデフォルトモデルであると考えられている。しかし、その詳細なメカニズムは十分に解明されていない。複数のエピジェネティック制御因子が神経分化において重要な役割を担うことが知られている。抑制的なクロマチンリモデリング因子であるNuRD複合体は、様々な生命現象に関与しているが、神経分化に果たす役割については未解明な部分が多い。本研究において申請者は、NuRD複合体を構成する因子であるCHD4が、多能性幹細胞であるES細胞における神経分化に重要な役割があることを見出した。マウスES細胞からの神経分化誘導において、<i>Chd4</i>をノックダウンしたところ、神経細胞への分化効率が低下した。また、NuRD複合体を構成する別の因子である<i>Mbd3</i>をノックダウンした場合においても神経細胞への分化効率が低下した。次に、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現の解析から、CHD4とMBD3はES細胞からの神経分化に必要な遺伝子群を共通に制御していることが示された。CHD4/NuRD複合体は一般的に転写を抑制する方向にはたらくことから、<i>Chd4</i>をノックダウンした時に発現量が増加する遺伝子群に着目したところ、<i>Nodal</i>、<i>Bmp4</i>、<i>Brachyury</i>、<i>Eomes</i>といった中内胚葉系列の分化を促進する遺伝子が含まれていた。CHD4/NuRD複合体が中内胚葉系列への分化を抑制することで神経分化を促進するという可能性を検証するために、中内胚葉系列への分化のマスター因子である<i>Brachyury</i>と<i>Eomes</i>をCRISPR/Cas9システムによりノックアウトし、中内胚葉系列へと分化できないES細胞を作製した。<i>Brachyury</i>/<i>Eomes</i>ダブルノックアウトES細胞において<i>Chd4</i>をノックダウンし、神経分化を誘導したところ、<i>Chd4</i>をノックダウンした野生型のES細胞を使った場合と比べて神経分化効率に大きな違いはなかった。このことから、CHD4/NuRD複合体が神経分化を促進するのは、中内胚葉系列への分化を抑制するためではない、ということが示された。次に、神経分化誘導時の発現上昇が<i>Chd4</i>のノックダウンにより顕著に抑制されるBCL2に着目した。BCL2は、神経分化に必要な因子であり、p53によって負に制御されることが知られている。CHD4/NuRD複合体がp53を制御するのか検証した結果、<i>Chd4</i>のノックダウンにより、p53の379番目のリジンのアセチル化が亢進し、それに伴いp53のタンパク質量が増加した。そこで、p53と<i>Chd4</i>を同時にノックダウンした結果、<i>Chd4</i>を単独でノックダウンした場合と比較し、神経細胞への分化効率が回復された。さらに、<i>Chd4</i>のノックダウンによる神経分化効率の低下がBCL2の過剰発現によって回復された。以上の結果から、CHD4/NuRD複合体は、p53を脱アセチル化し、p53のタンパク質量を減少させ、BCL2の発現を上昇させることで、神経分化を促進することが示された。本研究により、CHD4/NuRD複合体は、マウスES細胞の神経分化において、p53の脱アセチル化を促進させることで神経分化を制御していることが明らかとなり、細胞分化におけるCHD4/NuRD複合体による翻訳後修飾の重要性が示された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者はES細胞の神経分化において、クロマチンリモデリング因子であるCHD4/NuRD複合体がp53のタンパク質量を減少させることで、神経分化を制御することを明らかにした。これまで、CHD4がES細胞の神経分化に関わっているかについては未解明な部分があった。申請者はまず、マウスES細胞からの神経分化誘導において、*Chd4*のノックダウンを行い、神経細胞への分化効率を調べた。その結果、*Chd4*のノックダウンを行った細胞では、神経細胞への分化効率が低下していることが分かった。また、NuRD複合体を構成する因子である*Mbd3*のノックダウンを行い、神経細胞への分化誘導を行ったところ、神経分化効率が低下していることが分かった。したがって、CHD4とMBD3はES細胞の神経分化に重要な働きがあることが示唆された。続いて、申請者はCHD4/NuRD複合体が神経分化を制御するメカニズムを調べるため、マイクロアレイを用いて、*Chd4*のノックダウンによる神経分化誘導前後における遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。神経分化に伴ってCHD4/NuRD複合体依存的に発現が減少する遺伝子群を詳しく調べたところ、中内胚葉系列の分化を促進する遺伝子が含まれていることが分かった。そこで申請者は、CHD4/NuRD複合体が転写抑制因子であることから、CHD4/NuRD複合体が他系列の分化を抑制することで神経分化を促進している可能性を検証した。中内胚葉系列の分化を促進する*Brachyury*と*Eomes*をノックアウトし、中内胚葉に分化できないES細胞を作製し、このES細胞を用いて*Chd4*のノックダウンにより低下した神経分化効率が回復するかを調べた。その結果、神経分化効率が回復しなかったことから、他の可能性を検証した。神経分化に伴ってCHD4依存的に発現が上昇する遺伝子群を詳しく調べると、*Bcl2*が含まれていた。BCL2はES細胞の神経分化に重要な役割を担っていること、BCL2はp53によって負に制御されること、そして、ヒトがん細胞において、CHD4/NuRD複合体はp53の脱アセチル化に関与することから、申請者は、CHD4-p53-BCL2の一連の制御メカニズムが存在し、これによってES細胞の神経分化が制御されていると仮定した。まず、申請者はCHD4がp53の脱アセチル化に関与することをウェスタンブロットにより明らかにした。さらに、p53を*Chd4*と同時にノックダウンすることで、*Chd4*のノックダウンによって低下した神経分化効率が回復するかを調べたところ、その効率が一部回復されたことが分かった。さらに、BCL2を過剰発現したES細胞を用いることで、*Chd4*のノックダウンによって低下した神経細胞への分化効率が回復するかを調べたところ、その効率の一部が回復された。以上の結果から、CHD4/NuRD複合体はp53のタンパク質量を低下させることで、ES細胞の神経分化を制御することが示された。本論文は、ES細胞の神経分化においてCHD4/NuRD複合体の機能が重要であることを示し、ES細胞における神経分化のメカニズムの解明に大きく貢献するものである。したがって、生命科学に関する高度で幅広い学識、専攻分野における優れた研究能力、生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見が示されていると判断できる。また、本論文は、論理的かつ一貫性を持って記述されていた。以上より、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成31年1月28日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日：                      年                      月                      日